



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE

WO 9608576A1

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12P 7/42, 7/24	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/08576 (43) Date de publication internationale: 21 mars 1996 (21.03.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01173 (22) Date de dépôt international: 13 septembre 1995 (13.09.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/10889 13 septembre 1994 (13.09.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - I.N.R.A. [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex 07 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LESAGE-MEESSEN, Laurence [FR/FR]; 8, parc de la Sérane, F-13008 Marseille (FR). DELATTRE, Michel [FR/FR]; Bâtiment F, Le Jardin des Hespérides, 34, chemin Joseph-Aiguier, F-13009 Marseille (FR). HAON, Mireille [FR/FR]; Bâtiment B, Parc Bella-Vistra, 11, allée Sacoman, F-13016 Marseille (FR). ASTHER, Marcel [FR/FR]; Résidence les Palmiers, 5, allée Lumière, F-13006 La Ciotat (FR). (74) Mandataires: ORES, Irène etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: METHOD FOR OBTAINING VANILLIC ACID AND VANILLIN BY BIOCONVERSION BY AN ASSOCIATION OF FILAMENTOUS MICROORGANISMS (54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION D'ACIDE VANILLIQUE ET DE VANILLINE PAR BIOCONVERSION PAR UNE ASSOCIATION DE MICROORGANISMES FILAMENTEUX (57) Abstract <p>Method for the production of vanillic acid and vanillin by the bioconversion from ferulic acid. Ferulic acid is converted into vanillic acid by at least one filamentous fungus selected from the group consisting of the Ascomycetes and Basidiomycetes, or by at least one Ascomycetes strain; and vanillic acid is converted into vanillin by at least one filamentous fungus of the class Basidiomycetes.</p> (57) Abrégé <p>L'invention est relative à l'obtention de l'acide vanillique et de la vanilline, par bioconversion à partir de l'acide férulique. La transformation de l'acide férulique en acide vanillique est effectuée par au moins un champignon filamenteux choisi dans le groupe constitué par les Ascomycètes et les Basidiomycètes, ou au moins une souche d'Actinomycète et la transformation de l'acide vanillique en vanilline est effectuée par au moins un champignon filamenteux de la classe des Basidiomycètes.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PROCEDE D'OBTENTION D'ACIDE VANILLIQUE ET DE VANILLINE
PAR BIOCONVERSION PAR UNE ASSOCIATION DE MICROORGANISMES
FILAMENTEUX .

La présente Invention est relative à
5 l'obtention d'acide vanillique et de vanilline par
bioconversion.

Actuellement, la vanilline est l'arôme le
plus utilisé dans les industries agro-alimentaires. Or,
la production de vanilline naturelle à partir de gousses
10 de vanille ne couvre que 20% des besoins du marché et son
prix de revient est de l'ordre de 25 000F/kg.

La vanilline peut également être obtenue par
synthèse chimique ; toutefois, cette méthode d'obtention,
si elle convient pour la fabrication des parfums et des
15 cosmétiques, peut soulever dans les industries agro-
alimentaires des difficultés d'ordre législatif. En outre
les arômes de synthèse ont tendance par ailleurs à être
moins appréciés par les consommateurs que les arômes
d'origine naturelle.

20 C'est pourquoi l'on cherche à obtenir des
composés aromatiques produits grâce à des procédés biolo-
giques, qui mettent en oeuvre des microorganismes
(bactéries, levures, champignons), des cellules animales
ou végétales ou leurs systèmes enzymatiques.

25 La vanilline est produite par certains végé-
taux et micooorganismes, en particulier des champignons,
où elle constitue un des produits de dégradation de pré-
curseurs à noyau aromatique (acide férulique et acide
vanillique).

30 La Demande de brevet européen 453 368 au nom
de la Société PERNOD-RICARD, décrit la production de
vanilline naturelle par bioconversion d'acide férulique
ou d'acide vanillique, en présence d'un champignon fila-
menteux du groupe des Basidiomycètes, *Pycnoporus*
35 *cinnabarinus*.

Chez ce champignon, quatre voies métaboliques de transformation de l'acide férulique ont été identifiées :

5 - **Voie 1** : l'acide férulique est réduit en aldéhyde coniférylique puis en alcool coniférylique ; différents dimères sont ensuite formés à partir de ce composé. Cette voie est mineure.

10 - **Voie 2** : il y a coupure de la chaîne propénoïque de l'acide férulique avec perte de deux carbones et formation d'acide vanillique.

 - **Voie 3** : l'acide vanillique résultant de la voie 2 est réduit en vanilline par la Réductase I. La vanilline produite peut ensuite être réduite par la Réductase II en alcool vanillique.

15 - **Voie 4** : l'acide vanillique résultant de la voie 2 est hydroxylé et décarboxylé en méthoxyhydroquinone, par l'action d'une vanillate hydroxylase intracellulaire.

 Dans les conditions décrites dans la Demande EP 453 368, la production de vanilline par *P. cinnabarinus* MIC11, à partir de 300 mg/l d'acide férulique est au maximum de l'ordre de 45 mg/l (rendement molaire de conversion de 20,5 %), et à partir de 300 mg/l d'acide vanillique, cette production est au maximum de l'ordre de 81,4 mg/l (rendement molaire de conversion de 31%).

25 La présente Invention a pour but d'améliorer le rendement de la production de vanilline naturelle par bioconversion à partir de précurseurs à noyau aromatique (acide férulique et acide vanillique). Dans ce but, les Inventeurs ont cherché à améliorer le rendement de conversion de l'acide férulique en acide vanillique, et le rendement de conversion de l'acide vanillique en vanilline.

35 La présente Invention a pour objet un procédé d'obtention de l'acide vanillique par bioconversion à partir de l'acide férulique, lequel procédé est caracté-

risé en ce que ladite bioconversion est effectuée en utilisant une culture comprenant au moins une souche d'un champignon filamenteux choisi dans le groupe constitué par les Ascomycètes et les Basidiomycètes, ou au moins
5 une souche d'Actinomycète.

La présente Invention a également pour objet un procédé d'obtention de vanilline par bioconversion à partir de l'acide férulique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

10 - une étape de transformation de l'acide férulique en acide vanillique par le procédé défini ci-dessus ;

15 - une étape de transformation de l'acide vanillique en vanilline par au moins un champignon filamenteux de la classe des Basidiomycètes.

Selon une première variante du procédé d'obtention de vanilline conforme à l'Invention, les deux étapes sont effectuées séquentiellement. Dans ce cas le procédé conforme à l'Invention comprend:

20 - une étape au cours de laquelle on ajoute de l'acide férulique à une culture comprenant au moins une souche d'un champignon filamenteux choisi dans le groupe constitué par les Ascomycètes et les Basidiomycètes, ou au moins une souche d'Actinomycète, et l'on recueille
25 l'acide vanillique produit ;

30 - une étape au cours de laquelle on ajoute l'acide vanillique produit au cours de la première étape à une culture comprenant au moins une souche d'un champignon filamenteux de la classe des Basidiomycètes, et l'on recueille la vanilline produite.

Pour mettre en oeuvre cette variante, les champignons utilisés dans chacune des étapes sont cultivés séparément jusqu'à l'obtention d'une biomasse possédant les capacités nécessaires à la bioconversion (c'est
35 à dire une biomasse d'au moins 0,5 g de matière sèche par

litre de culture), et les cultures obtenues sont ensuite utilisées successivement.

5 Selon une deuxième variante du procédé conforme à l'Invention, les deux étapes sont effectuées simultanément. Dans ce cas l'on ajoute de l'acide férulique à une culture comprenant, pour la transformation de l'acide férulique en acide vanillique, au moins une souche d'un champignon filamenteux choisi dans le groupe constitué par les Ascomycètes et les Basidiomycètes, ou
10 au moins une souche d'Actinomycète, et, pour la transformation de l'acide vanillique en vanilline, au moins une souche de Basidiomycète qui peut être identique à ou différente de celle utilisée pour transformer l'acide férulique en acide vanillique, et l'on recueille la vanilline
15 produite.

Pour mettre en oeuvre cette deuxième variante, les champignons utilisés pour la transformation de l'acide férulique en acide vanillique et ceux utilisés pour la transformation de l'acide vanillique en vanilline
20 sont cultivés séparément jusqu'à l'obtention d'une biomasse possédant les capacités nécessaires à la bioconversion, et les cultures obtenues sont ensuite regroupées pour obtenir une co-culture permettant de réaliser la bioconversion en une seule étape.

25 Pour la bioconversion de l'acide férulique en acide vanillique, des Ascomycètes préférés appartiennent aux genres *Eurotium*, *Penicillium*, et *Aspergillus* ; des Basidiomycètes préférés appartiennent aux genres *Bjerkandera*, *Nidula*, *Nidularia*, *Phanerochaete*,
30 *Pycnoporus*, *Trametes*, *Lentinus*, et *Ischnoderma* ; des Actinomycètes préférés appartiennent aux *Streptomyces*.

Pour la bioconversion de l'acide vanillique en vanilline, des Basidiomycètes préférés appartiennent aux genres *Bjerkandera*, *Nidula*, *Nidularia*, *Phanerochaete*,
35 *Pycnoporus*, *Trametes*, *Lentinus*, et *Ischnoderma*.

Le Tableau I ci-après mentionne, de façon non limitative, quelques espèces convenant à la mise en oeuvre du procédé selon l'Invention, et quelques souches testées par les Inventeurs, et qui se sont avérées particulièrement performantes dans ce cadre.

TABLEAU I

	Espèces	Exemple de souches utilisées
10	Actinomycètes :	
	- <i>Streptomyces setonii</i>	ATCC 25497
	Ascomycètes :	
	- <i>Eurotium chevalieri</i>	
15	- <i>Penicillium verrucosum</i>	
	- <i>cyclopium</i>	
	- <i>Aspergillus oryzae</i>	
	- <i>Aspergillus versicolor</i>	
	- <i>Aspergillus niger</i>	LMTCC N° 2.7 (CNCM I-1472)
	Basidiomycètes	
20	- <i>Ischnoderma benzoïum</i>	CBS 250.30
	- <i>Bjerkandera adusta</i>	CBS 595.79
	- <i>Nidula niveo-tomentosa</i>	ATCC 38357
	- <i>Phanerochaete sordida</i>	IHEM 3730
	- <i>Phanerochaete</i>	
25	- <i>chrysosporium</i>	MIC 247 (CNCM I-1471)
	- <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	MUCL 38467
	- <i>Trametes pini</i>	CBS 210.36
	- <i>Lentinus edodes</i>	CBS 454.59

Il est possible, selon les cas, de se procurer les différentes souches citées, auprès de la collection MUCL, 3 place Croix du Sud, 1348, Louvain La Neuve, Belgique, auprès de la collection IHEM, 14 rue J. Wytsman, 1050, Bruxelles, Belgique, auprès de la collection CBS, Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 AG Baarn,

et auprès de la collection ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 USA.

5 D'autre part, la souche d'*Aspergillus niger* LMTc 2.7 et la souche de *Phanerochaete chrysosporium* MIC 247 ont été déposées le 31 août 1994 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 26 rue du Docteur Roux, à Paris, sous les numéros respectifs I-1472 et I-1471.

10 Les organismes peuvent être cultivés sous forme de cellules libres, ou sous forme de cellules immobilisées sur un support hydrophile ou hydrophobe, de préférence rugueux.

15 Les cultures sont effectuées, de manière classique, à partir d'un inoculum qui peut être constitué par des spores, par des fragments de mycélium, ou par une préculture de mycélium. Le milieu de culture comporte une source de carbone, au moins une source d'azote, des sels minéraux, et est additionné d'extrait de levure. Les
20 constituants de ce milieu peuvent être ceux qui sont classiquement utilisés pour la culture de l'espèce de champignon concernée.

Toutefois, les Inventeurs ont constaté que lorsque la source de carbone utilisée comprend ou est constituée par au moins un phospholipide, on observe une
25 accélération de la bioconversion, en particulier en ce qui concerne la bioconversion de l'acide férulique en acide vanillique.

Avantageusement, le milieu de culture comprend au moins un phospholipide choisi dans le groupe
30 constitué par la phosphatidylcholine, la lysophosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, l'acylphosphatidyléthanolamine, le phosphatidylinositol, et l'acide phosphatidique.

35 Préférentiellement ce phospholipide ou mélange de phospholipides est utilisé à une concentration comprise entre 0,1 et 20 g/l.

Par exemple on peut utiliser un mélange de phospholipides de soja comprenant :

- 12 % de phosphatidylcholine et lysophosphatidylcholine ;
- 5 - 31 % de phosphatidyléthanolamine et acylphosphatidyléthanolamine ;
- 27 % de phosphatidylinositol ;
- 30 % d'acide phosphatidique.

10 Pour améliorer le rendement de bioconversion de l'acide férulique en acide vanillique, on peut également activer la bêta-oxydation peroxysomale.

Les Inventeurs ont en outre observé que l'utilisation de cellobiose comme seule source de carbone du champignon, ou en complément d'une autre source de
15 carbone, par exemple d'un sucre tel que le maltose, permet de limiter très significativement la production de méthoxyhydroquinone, et donc d'augmenter le rendement de bioconversion de l'acide vanillique en vanilline.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du
20 procédé conforme à l'Invention, la source de carbone utilisée comprend ou est constituée par du cellobiose.

Selon une disposition préférée de ce mode de mise en oeuvre, le milieu de culture comprend du cellobiose.

25 Le cellobiose peut être ajouté dès le début de la culture, à une concentration comprise entre 0,5 g/l et 10 g/l, préférentiellement 5 g/l, et/ou peu de temps avant, ou simultanément à l'addition de l'acide férulique ou de l'acide vanillique, à une concentration comprise
30 dans ce cas entre 0,5 g/l et 5 g/l, préférentiellement 2,5 g/l.

Pour initier la bioconversion, on additionne à la culture le précurseur, à savoir soit l'acide férulique, puis l'acide vanillique, dans le cas de la première variante du procédé, soit l'acide férulique, dans
35 le cas de la deuxième variante du procédé.

Il est avantageux d'ajouter en même temps que le précurseur, une quantité, comprise entre 0,01 et 5 g/l d'au moins un produit constituant une source de carbone, ou une source d'azote, ou de sels minéraux, ou de lipides, ou d'un mélange de ces différents produits.

On citera parmi les sources de carbone utilisables dans ce but, le maltose, le cellobiose, l'acide galacturonique, le xylose, le rhamnose, l'arabinose ; parmi les sources d'azote, le tartrate diammonium, l'extrait de levure ; parmi les sels minéraux, les sels de calcium, de potassium, de magnésium ; parmi les lipides, les acides gras émulsifiés, et les phospholipides.

L'acide férulique est une matière première aisément disponible, et peu coûteuse. Il est présent par exemple dans la fraction pariétale de sous-produits agricoles tels que les pulpes de betterave (0,9% du poids sec) ou les sons de céréales (2,0% du poids sec dans les sons de maïs). L'acide vanillique peut en particulier être produit à partir de l'acide férulique au cours de la première étape du procédé conforme à l'Invention.

L'acide férulique peut être utilisé sous forme libre ou bien sous forme liée ; on entend par acide férulique lié un ester d'un sucre ou d'un oligosaccharide avec l'acide férulique.

L'acide férulique libre ou l'acide vanillique peuvent être ajoutés tels quels, sous forme de cristaux, ou sous forme d'une solution de leurs sels de sodium, potassium, ou ammonium.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à l'invention, l'acide férulique ou l'acide vanillique sont ajoutés à raison de 0,1 à 2 g/l de culture, de préférence 0,3 g/l. Si l'on utilise l'acide férulique lié, ou bien un sel d'acide férulique, ou d'acide vanillique, on ajustera la concentration de manière à ce qu'elle corresponde à la gamme de concentra-

tions en acide férulique ou en acide vanillique indiquée ci-dessus.

5 Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à l'invention, l'ajout de l'acide férulique ou de l'acide vanillique s'effectue après 12 à 96 h de culture. Toutefois, lorsque l'ajout en une seule fois aboutirait à des concentrations toxiques pour le champignon, à savoir des concentrations supérieures à 2 g/l pour l'acide férulique et à 2 g/l pour l'acide
10 vanillique, des ajouts séquentiels ou en continu seront effectués.

Les Inventeurs ont en outre observé qu'il était possible et particulièrement avantageux, de mettre en oeuvre le procédé selon l'Invention en présence d'une
15 résine non-ionique, de préférence de type hydrophobe. En effet, non seulement l'acide vanillique, mais également la vanilline sont toxiques pour les champignons, à des concentrations supérieures à 2 g/l. L'utilisation de résine permet de piéger ces métabolites et de maintenir
20 leurs concentrations en dessous du seuil de toxicité.

D'autre part, l'utilisation de résine pour piéger la vanilline permet également d'éliminer celle-ci du mélange réactionnel avant qu'elle soit réduite en alcool vanillique.

25 L'acide vanillique ou la vanilline fixés sur la résine peuvent être récupérés, par élution avec un solvant approprié, tel par exemple que l'éthanol.

Des résines non-ioniques pouvant être utilisées sont, à titre d'exemple non-limitatif, les
30 suivantes :

- Résines AMBERLITE : XAD2 ; XAD4 ; XAD7 ;
- Résine DUOLITE : XAD761 ;
- Résine DOWEX : S112

35 Les résines XAD761 et S112 sont préférées pour fixer l'acide vanillique, et les résines XAD2, XAD4, XAD7, et S112, sont préférées pour fixer la vanilline.

A titre d'exemple, la résine XAD2 permet de fixer 98% de la vanilline ; la capacité d'adsorption de cette résine est de l'ordre de 20 mg de vanilline par gramme de résine.

5 Préférentiellement, l'ajout de résine est effectué dès l'apparition de la vanilline.

 L'ajout de résine peut s'effectuer, par exemple, soit directement dans le récipient de culture, soit par circulation du milieu de culture dans une boucle
10 externe contenant la résine.

 Pour éliminer l'acide vanillique et la vanilline du milieu de culture et les récupérer au fur et à mesure de leur production, il est également possible de faire appel à d'autres techniques, telles que
15 l'ultrafiltration, l'osmose inverse ou la capture sur charbon actif.

 Pour améliorer de façon significative le rendement de bioconversion de l'acide vanillique en vanilline, on peut également choisir une souche de basidiomycète qui ne forme que très peu d'alcool vanillique, et
20 accumule la vanilline produite.

 Il s'agit par exemple de basidiomycètes de l'ordre des Nidulariales.

 La vanilline produite devenant très rapidement toxique pour le métabolisme du champignon, il est
25 avantageux dans ce cas de la piéger en utilisant une résine, comme indiqué ci-dessus.

 La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se
30 réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé conforme à l'Invention.

 Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont ils ne constituent en aucune
35 manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Réalisation des cultures**A) Champignons :**

La composition du milieu de base est donnée ci-dessous :

Composition du milieu :

5	Maltose	20 g/l
	Tartrate diammonium	1,842 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
	CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,0132 g/l
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g/l
10	Extrait de levure	0,5 g/l

Le milieu est stérilisé par autoclavage 20 min à 120 °C.

L'inoculation est effectuée par des fragments mycéliens, des spores ($2 \cdot 10^5$ spores/ml), ou une pré-culture de mycélium, comme décrit dans la Demande EP 453 368.

Après inoculation, les cultures sont incubées à 30°C et soumises à une agitation de 120 tours/min.

Après 12 à 96 h de culture, l'acide férulique ou l'acide vanillique (dans le cas de la mise en oeuvre du procédé en deux étapes) sont ajoutés. Ils sont utilisés sous forme de sel en solution dans l'eau ; la solution a été préalablement stérilisée par filtration (membrane de 0,2 µm). La solution est ajoutée en quantité suffisante pour obtenir une concentration finale correspondant à 0,3 g d'acide férulique ou d'acide vanillique par litre de culture.

B) Actinomycètes :

La composition du milieu de base est la suivante :

30	Glycérol	5 g/l
	Extrait de levure	2 g/l

Le milieu est stérilisé par autoclavage 20 min à 120 °C.

L'inoculation est effectuée par des fragments de mycélium aérien prélevés sur un milieu solide malt/agar.

Après inoculation, les cultures sont incubées à 30°C et soumises à une agitation de 120 tours/min.

L'acide férulique, sous forme de sel, est ajouté en tout début de culture, à la concentration de 1 g/l.

C) Suivi de la bioconversion :

La bioconversion, au cours de la mise en oeuvre du procédé conforme à l'Invention est suivie par le dosage des métabolites produits. Pour procéder à ce dosage, un aliquot du milieu de culture est prélevé stérilement à intervalles de temps réguliers. Cet aliquot est ensuite filtré (membrane de 0,2 µm) et une analyse par HPLC du filtrat est réalisée, pour détecter et doser les métabolites produits.

Conditions d'analyse HPLC

- phase inverse = colonne BONDAPACK C18
- solvant : CH₃COOH 0,01 % dans H₂O/méthanol
- détection en UV à 280 nm

EXEMPLE 2 : Bioconversion de l'acide férulique en acide vanillique

A) Par un champignon

La souche d'*Aspergillus niger* MIC 373, déposée le 31 août 1994 auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes sous le numéro I-1472, a été mise en culture comme indiqué à l'exemple 1 ci-dessus.

L'acide férulique a été ajouté en continu à raison de 430 mg/l par 24 heures.

L'acide férulique et ses métabolites sont dosés comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus.

Les résultats obtenus après 15 jours de croissance de la culture sont indiqués dans le Tableau II ci dessous.

Légende du Tableau II :

Colonne 1 : Acide férulique consommé (mg/l) ;

Colonne 2 : Acide vanillique produit (mg/l) ;

Colonne 3 : Methoxyhydroquinone produite (mg/l) ;

Colonne 4 : Rendement molaire (%) ; le rendement molaire est défini comme le nombre de moles d'acide vanillique produites pour 100 moles d'acide férulique consommées.

TABLEAU II

1	2	3	4
5055	3600	109	82

On observe une consommation totale de l'acide férulique ajouté. Celui-ci est transformé en grande majorité (82%) en acide vanillique qui est faiblement (2%) métabolisé en méthoxyhydroquinone, et pas du tout en vanilline et alcool vanillique.

B) Par un actinomycète :

La souche de *Streptomyces setonii* ATCC 25497 a été mise en culture comme indiqué à l'exemple 1 ci-dessus.

L'acide férulique, sous forme de sel, est ajouté en tout début de culture, à la concentration de 1 g/l.

L'acide férulique et ses métabolites sont dosés comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus.

Les résultats obtenus après 100 heures de croissance de la culture sont indiqués dans le Tableau III ci dessous.

Légende du Tableau III :

Colonne 1 : Acide férulique consommé (mg/l) ;

Colonne 2 : Acide vanillique produit (mg/l) ;

Colonne 3 : Rendement molaire (%).

TABLEAU III

1	2	3
880	332	43

EXEMPLE 3 : Activation de la bioconversion de l'acide férulique en acide vanillique par ajout de phospholipides de soja

La source de phospholipides utilisée est le
5 NAT 89 fourni par la Société Natterman Phospholipid GmbH
(Cologne, Allemagne). La composition du NAT 89 est la
suivante :

- 12 % de phosphatidylcholine et de lysophosphatidyl-
choline
- 10 31 % de phosphatidylethanolamine et acyl-phosphati-
dylethanolamine
- 27 % de phosphatidylinositol
- 30 % d'acide phosphatidique

Le NAT89 (20 g/l) a été utilisé comme
15 source de carbone à la place du maltose dans les cultures
d'*Aspergillus niger*. Les résultats obtenus montrent une
bioconversion plus rapide de l'acide férulique en acide
vanillique.

**EXEMPLE 4 : Activation de la bioconversion de l'acide
20 vanillique en vanilline par l'utilisation de résine**

Pour illustrer cet exemple, une souche repré-
sentative d'une espèce de Basidiomycète produisant prin-
cipalement de l'alcool vanillique a été choisie.

Il s'agit de la souche MIC 247 de
25 *Phanerochaete chrysosporium*, déposée le 31 août 1994
auprès de la Collection Nationale de Culture de
Microorganismes sous le numéro I-1471. Cette souche a été
mise en culture comme indiqué à l'exemple 1 ci-dessus.

L'acide vanillique a été ajouté séquentielle-
30 ment, à savoir : 0,3 g/l au bout de 3 jours de culture,
puis 0,3 g/l tous les jours.

Pour l'expérience 2, de la résine XAD2
(AMBERLITE) stérile est ajoutée à raison de 10%
(poids/volume) après 3 jours + 6h de culture du champi-
35 gnon, soit 6 h après l'ajout d'acide vanillique (à
300 mg/l).

L'acide vanillique et ses métabolites sont dosés comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus.

Les résultats, indiqués dans le Tableau IV ci-dessous, sont donnés après 4 jours et 7 jours (Expérience 1), ou après 6 jours (expérience 2), de croissance de la culture.

Légende du Tableau IV :

Colonne 1 : Numéro de l'expérience, et âge de la culture ;

Colonne 2 : Acide vanillique consommé (mg/l) ;

Colonne 3 : Vanilline produite (mg/l) ;

Colonne 4 : Alcool vanillique produit (mg/l) ;

Colonne 5 : Méthoxyhydroquinone produite (mg/l) ;

Colonne 6 : Rendement molaire (%) ; le rendement molaire est ici défini comme le nombre de moles de vanilline produites pour 100 moles d'acide vanillique consommées.

TABLEAU IV

1	2	3	4	5	6
N°1 4 j	277	125	89	17	50
7 j	1545	3	762	175	0,2
N°2 6j	838	628	51	86	82

Dans l'expérience 1, on observe dès le quatrième jour une forte production d'alcool vanillique associée à la production de vanilline. Au septième jour, toute la vanilline produite a été métabolisée en alcool vanillique.

Dans l'expérience 2, la vanilline a été fixée par la résine au fur et à mesure de sa production (94 % de la vanilline produite a été fixée sur la résine

utilisée), avant qu'elle ne soit transformée en alcool vanillique.

EXEMPLE 5 : Activation de la bioconversion de l'acide vanillique en vanilline par l'utilisation de cellobiose

5 Pour illustrer cet exemple, une souche représentative d'une espèce de Basidiomycète produisant principalement de la méthoxyhydroquinone a été choisie.

10 Il s'agit de la souche MUCL 38467 de *Pycnoporus cinnabarinus*. Cette souche a été mise en culture comme indiqué à l'exemple 1 ci-dessus.

L'acide vanillique a été ajouté séquentiellement, à savoir : 0,3 g/l au bout de 3 jours de culture, puis 0,3 g/l tous les jours.

15 Pour l'expérience 1, la source de carbone utilisée est le maltose, à une concentration de 20 g/l.

Pour l'expérience 2, la source de carbone utilisée est le cellobiose, à raison de 5 g/l.

L'acide vanillique et ses métabolites sont dosés, comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus.

20 Les résultats, après 7 jours de croissance de la culture, sont indiqués dans le Tableau V ci-dessous.
Légende du Tableau V :

Colonne 1 : Numéro de l'expérience ;
Colonne 2 : Acide vanillique consommé (mg/l) ;
25 Colonne 3 : Vanilline produite (mg/l) ;
Colonne 4 : Méthoxyhydroquinone produite (mg/l) ;
Colonne 5 : Alcool vanillique produit (mg/l) ;
Colonne 6 : Rendement molaire (%) ; le rendement molaire est défini comme le nombre de moles de vanilline produites pour 100 moles d'acide vanillique consommées.
30

TABLEAU V

	1	2	3	4	5	6
5	N°1	1198	166	709	30	15
	N°2	941	481	62	70	59

Dans l'expérience 1, on observe après 7 jours de culture des productions élevées en vanilline mais aussi en méthoxyhydroquinone.

10 Dans l'expérience 2, l'utilisation de cellobiose comme source de carbone, a permis de limiter très significativement la production de méthoxyhydroquinone, et d'augmenter celle de vanilline.

15 Dans une deuxième série d'expériences décrites ci-dessous, où le maltose est utilisé comme source de carbone principale, l'ajout de cellobiose avant l'ajout du précurseur permet également de limiter très significativement la production de méthoxyhydroquinone et d'augmenter celle de vanilline.

20 Les milieux et conditions de culture suivants ont été utilisés:

- Maltose 1 : Seule source de carbone : maltose à 20 g/l.
- Maltose 2 : Source de carbone : maltose à 20 g/l + addition de 0,25% (p/v) de cellobiose après 3 jours d'incubation, 2 h avant l'ajout d'acide vanillique.
- 25 - Maltose 3 : Source de carbone : maltose à 20 g/l + addition de 0,35% (p/v) de cellobiose après 3 jours d'incubation, 2 h avant l'ajout d'acide vanillique.
- Maltose 4 : Source de carbone : maltose à 20 g/l + addition de 0,5% (p/v) de cellobiose après 3 jours d'incubation, 2 h avant l'ajout d'acide vanillique.
- 30 - Maltose 2C : Source de carbone : maltose à 20 g/l + addition de 0,25% (p/v) de cellobiose après 3 jours, 4 jours, 5 jours, et 6 jours d'incubation, chaque ajout précédant de 2 heures l'ajout d'acide vanillique.
- 35

- Maltose 3C : Source de carbone : maltose à 20 g/l + addition de 0,35% (p/v) de cellobiose après 3 jours, 4 jours, 5 jours, et 6 jours d'incubation, chaque ajout précédant de 2 heures l'ajout d'acide vanillique.
- 5 - Maltose 4C : Source de carbone : maltose à 20 g/l + addition de 0,5% (p/v) de cellobiose après 3 jours, 4 jours, 5 jours, et 6 jours d'incubation, chaque ajout précédant de 2 heures l'ajout d'acide vanillique.

Les résultats sont indiqués dans le Tableau

10 VI ci-dessous.

Légende du Tableau VI :

- Colonne 1 : Numéro de l'expérience ;
- Colonne 2 : Acide vanillique consommé (mg/l) ;
- Colonne 3 : Vanilline produite (mg/l) ;
- 15 Colonne 4 : Methoxyhydroquinone produite (mg/l) ;
- Colonne 5 : Alcool vanillique produit (mg/l) ;
- Colonne 6 : Rendement molaire (%) ; le rendement molaire est ici défini comme le nombre de moles de vanilline produites pour 100 moles d'acide vanillique consommées.

TABLEAU VI

20

25

30

1	2	3	4	5	6
Maltose1	1198	166	709	30	14
Maltose2	1199	342	466	26	28
Maltose3	1192	447	350	27	37
Maltose4	1195	388	393	25	32
Maltose2C	1198	583	541	76	49
Maltose3C	1198	457	526	72	51
Maltose4C	1197	642	476	62	54

Exemple 6 : Utilisation d'une souche produisant principalement de la vanilline

Pour illustrer cet exemple, une souche représentative d'une espèce de Basidiomycète accumulant la vanilline a été choisie.

Il s'agit d'une souche de *Nidula niveo-tomentosa* qui est accessible auprès de l'ATCC sous le numéro 38357. Cette souche a été mise en culture comme indiqué à l'exemple 1 ci-dessus.

L'acide vanillique a été ajouté séquentiellement, à savoir : 0,3 g/l au bout de 3 jours de culture, puis 0,3 g/l tous les jours.

L'acide vanillique et ses métabolites sont dosés comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus.

Les résultats, au 8ème jour de croissance de la culture, sont indiqués dans le Tableau VII ci-dessous.

Légende du Tableau VII :

Colonne 1 : Acide vanillique consommé (mg/l) ;

Colonne 2 : Vanilline produite (mg/l) ;

Colonne 3 : Alcool vanillique produit (mg/l) ;

Colonne 4 : Méthoxyhydroquinone produite (mg/l) ;

Colonne 5 : Rendement molaire (%).

TABLEAU VII

1	2	3	4	5
1252	444	20	334	39

Cette souche accumulant la vanilline produite, très peu d'alcool vanillique est obtenu.

Pour optimiser l'utilisation de cette souche, on peut d'une part piéger la vanilline au fur et à mesure de sa production, par exemple en utilisant des résines comme décrit à l'exemple 4 ci-dessus, et d'autre part ajouter du cellobiose afin de limiter la quantité de méthoxyhydroquinone produite, comme décrit à l'exemple 5 ci-dessus.

REVENDEICATIONS

1) Procédé d'obtention de l'acide vanillique par bioconversion à partir de l'acide férulique, caracté-
risé en ce que ladite bioconversion est effectuée en uti-
5 lisant une culture comprenant au moins une souche d'un champignon filamenteux choisi dans le groupe constitué par les Ascomycètes et les Basidiomycètes, ou au moins une souche d'Actinomycète.

2) Procédé d'obtention de vanilline par bio-
10 conversion à partir de l'acide férulique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de transformation de l'acide férulique en acide vanillique par un procédé selon la revendication 1 ;

15 - une étape de transformation de l'acide vanillique en vanilline par au moins un champignon filamenteux de la classe des Basidiomycètes.

3) Procédé d'obtention de vanilline selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend:

20 - une étape au cours de laquelle l'on ajoute de l'acide férulique à une culture comprenant au moins une souche d'un champignon filamenteux choisi dans le groupe constitué par les Ascomycètes et les Basidiomycètes, ou au moins une souche d'Actinomycète, et
25 l'on recueille l'acide vanillique produit ;

- une étape au cours de laquelle on ajoute l'acide vanillique produit au cours de la première étape à une culture comprenant au moins une souche d'un champignon filamenteux de la classe des Basidiomycètes, et l'on
30 recueille la vanilline produite.

4) Procédé d'obtention de vanilline selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on ajoute de l'acide férulique à une culture comprenant au moins une
35 souche d'un champignon filamenteux choisi dans le groupe constitué par les Ascomycètes et les Basidiomycètes, ou

au moins une souche d'Actinomycète, et l'on recueille la vanilline produite.

5) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on met en oeuvre au moins une souche choisie dans le groupe constitué par : les souches d'Ascomycètes appartenant aux genres *Eurotium*, *Penicillium*, et *Aspergillus* ; les souches de Basidiomycètes appartenant aux genres *Bjerkandera*, *Nidula*, *Nidularia*, *Phanerochaete*, *Pycnoporus*, *Trametes*, *Lentinus*, et *Ischnoderma*, et les souches d'Actinomycètes appartenant au genre *Streptomyces*.

6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'on met en oeuvre une souche d'*Aspergillus niger* déposée le 31 août 1994 auprès de la CNCM, sous le numéro I-1472.

7) Procédé selon une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que l'on met en oeuvre, pour la deuxième étape au moins une souche choisie dans le groupe constitué par des Basidiomycètes appartenant aux genres *Bjerkandera*, *Nidula*, *Nidularia*, *Phanerochaete*, *Pycnoporus*, *Trametes*, *Lentinus*, et *Ischnoderma*.

8) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'on met en oeuvre une souche de *Phanerochaete chrysosporium* déposée le 31 août 1994 auprès de la CNCM, sous le numéro I-1471.

9) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le milieu de culture comporte une source de carbone qui comprend ou est constituée par au moins un phospholipide.

10) Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce que ledit phospholipide est choisi dans le groupe constitué par la phosphatidylcholine, la lysophosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, l'acylphosphatidyléthanolamine, le phosphatidylinositol, et l'acide phosphatidique.

11) Procédé selon une quelconque des revendications 9 ou 10 caractérisé en ce que ledit phospholipide ou mélange de phospholipides est utilisé à une concentration comprise entre 0,1 et 20 g/l.

5 12) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le milieu de culture comporte une source de carbone qui comprend ou est constituée par du cellobiose.

10 13) Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le milieu de culture comprend du cellobiose à une concentration comprise entre 0,5 g/l et 10 g/l.

15 14) Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le milieu de culture comprend du cellobiose à une concentration d'environ 5g /l.

15) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que l'acide férulique est ajouté à raison de 0,1 à 2 g/l.

20 16) Procédé selon une quelconque des revendications 2 à 15, caractérisé en ce que l'acide vanillique est ajouté à raison de 0,1 à 2 g/l.

17) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre en présence d'une résine hydrophobe.

25 18) Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que ladite résine de type hydrophobe est choisie dans le groupe constitué par les résines XAD2, XAD4, XAD7, XAD761, et S112.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No.

PC1/FR 95/01173

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12P7/42 C12P7/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 453 368 (PERNOD-RICARD S. A., FR.) 23 October 1991 cited in the application see claims	1
A	US,A,5 128 253 (LABUDA, IVICA M. ET AL) 7 July 1992 see claims	1
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 January 1996

Date of mailing of the international search report

11.01.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Delanghe, L

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 19, 9 May 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 239831, MIDDELHOVEN, WOUTER J. 'Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeasts and yeastlike fungi: a literature review and an experimental approach' see abstract & ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1993), 63(2), 125-44 CODEN: ALJMAO;ISSN: 0003-6072, ----	1
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 23, 5 December 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 276417, FALCONNIER, B. ET AL 'Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus Pycnoporus cinnabarinus I-937: Identification of metabolic pathways' see abstract & J. BIOTECHNOL. (1994), 37(2), 123-32 CODEN: JBITD4;ISSN: 0168-1656, -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/FR 95/01173

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0453368	23-10-91	FR-A- 2661189	25-10-91
		JP-A- 7087987	04-04-95
		US-A- 5262315	16-11-93
US-A-5128253	07-07-92	CA-A- 2069361	01-12-92
		JP-A- 5244965	24-09-93
		US-A- 5279950	18-01-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

e Internationale No
PCI/FR 95/01173

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12P7/42 C12P7/24

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP,A,0 453 368 (PERNOD-RICARD S. A., FR.) 23 Octobre 1991 cité dans la demande voir revendications ---	1
A	US,A,5 128 253 (LABUDA, IVICA M. ET AL) 7 Juillet 1992 voir revendications --- -/--	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 Janvier 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11.01.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office European des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Delanghe, L

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 19, 9 Mai 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 239831, MIDDELHOVEN, WOUTER J. 'Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeasts and yeastlike fungi: a literature review and an experimental approach' voir abrégé & ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1993), 63(2), 125-44 CODEN: ALJMAO;ISSN: 0003-6072, ---	1
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 23, 5 Décembre 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 276417, FALCONNIER, B. ET AL 'Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus Pycnoporus cinnabarinus I-937: Identification of metabolic pathways' voir abrégé & J. BIOTECHNOL. (1994), 37(2), 123-32 CODEN: JBITD4;ISSN: 0168-1656, -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Deposition Internationale No
PCT/FR 95/01173

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0453368	23-10-91	FR-A- 2661189	25-10-91
		JP-A- 7087987	04-04-95
		US-A- 5262315	16-11-93
US-A-5128253	07-07-92	CA-A- 2069361	01-12-92
		JP-A- 5244965	24-09-93
		US-A- 5279950	18-01-94